

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 476 920**

51 Int. Cl.:

**G01N 21/64** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

**G01N 33/543** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.04.2009 E 09729093 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.06.2014 EP 2274613**

54 Título: **Método para ensayos de aglutinación serológica realizados en una muestra líquida de película fina**

30 Prioridad:

**02.04.2008 US 41784**

**02.04.2008 US 41791**

**02.04.2008 US 41790**

**02.04.2008 US 41794**

**02.04.2008 US 41797**

**09.04.2008 US 43571**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**15.07.2014**

73 Titular/es:

**ABBOTT POINT OF CARE, INC. (100.0%)**  
**400 College Road East**  
**Princeton, NJ 08540, US**

72 Inventor/es:

**WARDLAW, STEPHEN, C. y**  
**LEVINE, ROBERT, A.**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 476 920 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Método para ensayos de aglutinación serológica realizados en una muestra líquida de película fina

### Antecedentes de la invención

#### 1. Campo Técnico

5 Esta descripción se refiere a un método y sistema para realizar un ensayo de aglutinación serológica en una muestra líquida. El sistema proporciona un método simple para crear una mezcla muestra/reactivo in situ dentro de una cámara de análisis de muestras sin el uso de ningún componente de manipulación de fluidos de precisión. Las concentraciones relativas y absolutas de los reactivos se pueden determinar en cualquier área pequeña del recipiente de reacción.

#### 10 2. Información de Antecedentes

En la mayoría de los ensayos es necesario proporcionar una dilución exacta de la muestra a analizar para que la concentración del analito se pueda llevar al intervalo útil del ensayo, y debido a que esta dilución afecta a la concentración del analito, la precisión y exactitud del ensayo dependen en gran medida de la precisión y exactitud de la dilución. Una razón para esta dilución es que los inmunoensayos se ven afectados por un fenómeno conocido como el efecto prozona. El término "prozona", tal como se usa en esta descripción, se referirá a las condiciones de exceso de anticuerpos en las que generalmente en los inmunoensayos basados en precipitación o aglutinación se inhiben o impiden las reacciones, la postzona, en la que las condiciones de exceso de antígenos en un inmunoensayo inhiben las reacciones de aglutinación o precipitación, y el "efecto gancho", en el que las condiciones de exceso de antígenos provocan resultados falsamente bajos. Las condiciones en las que se dan los efectos prozona pueden provocar resultados falsos negativos y falsamente bajos, con resultados catastróficos para el paciente.

Cada combinación de ensayos tiene un intervalo de trabajo definido empíricamente, y los ensayos se deben realizar con muestras y reactivos en las diluciones adecuadas. Este tipo de dilución se ha realizado tradicionalmente por medio del uso de componentes de manipulación de fluidos de precisión o de la repetición manual del ensayo a diluciones mayores del anticuerpo para ver si el negativo es un verdadero negativo. Aunque estas pueden ser muy exactas, requieren una calibración cuidadosa y añaden una gran complejidad a la instrumentación automatizada. Además, el intervalo de analito presente en la muestra puede superar el intervalo dinámico del ensayo y puede requerir la dilución adicional de la muestra para obtener resultados exactos. Además, la técnica anterior requiere muchas cámaras para contener las diversas concentraciones de reactivos.

Los ensayos serológicos, tales como para los anticuerpos hacia patógenos de enfermedades infecciosas, son importantes ya que indican la inmunidad existente debida a la inmunización o a la exposición previa o actual, dependiendo de la clase de inmunoglobulina presente, hacia el agente infeccioso. De forma similar, se pueden usar para detectar la autoinmunidad, y similares. Existen varios tipos de ensayos realizados, que incluyen la aglutinación, fijación del complemento, precipitación, etc. Una característica casi universal de tales ensayos es la necesidad de diluir la muestra un cierto número de veces para detectar el punto en el que los anticuerpos ya no son eficaces para provocar un ensayo positivo. Esto se denomina "título", que es la dilución más elevada del suero o plasma del paciente que produce una aglutinación detectable o una reacción medida con el antígeno de ensayo. Esto requiere, de hecho, la ejecución de muchos ensayos distintos en cámaras distintas para llegar al resultado. Otro problema de tales ensayos es que los puntos finales a veces son difíciles de determinar, lo que añade un error significativo a la determinación del título. La automatización puede incrementar la eficacia y la exactitud del ensayo, pero realizar las diluciones mediante un instrumento es muy difícil y consume tiempo, lo que incluye la necesidad de definir primero la dilución deseada, que puede variar de ensayo a ensayo, y las múltiples etapas de dilución son muy complejas.

El documento US-4197088 describe un método para la determinación cualitativa y cuantitativa de reacciones inmunológicas. El documento EP-0366151 describe un método y aparato para un inmunoensayo fotoacústico. El documento WO-02/23154 describe ensayos basados en la agregación. El documento EP-1365240 describe métodos, aparatos, y reactivos para inmunoensayos. El documento US-5270166 describe inmunoensayos que emplean anticuerpos anti-hapteno genéricos y materiales para el uso en ellos.

Seria deseable proporcionar un método y aparato para medir títulos de anticuerpos en un sistema automatizado que no requiera múltiples diluciones y que elimine el riesgo de falsos negativos debido al efecto prozona.

#### 50 Sumario de la invención

La presente invención proporciona métodos para realizar un ensayo de aglutinación serológica, según las reivindicaciones 1 y 6.

Se puede usar un marcador sensible para permitir la medida de la concentración de los reactivos añadidos a la cámara in vitro en el área de la reacción a analizar. Un marcador sensible en esta descripción significa un colorante o sustancia detectable que no interfiere con la reacción a analizar y que se difunde a una velocidad cercana a la de

los reactivos a los que se añade. Los marcadores sensibles pueden ser un colorante o colorantes que se pueden medir por medios ópticos tales como absorción o emisión fluorescente. El marcador sensible está presente de manera homogénea, en disolución o en suspensión coloidal, con al menos uno de dos o más líquidos que se van a añadir posteriormente, y que se van a dejar mezclar, en la cámara de análisis fina que se usa.

5 La altura de la cámara puede ser menor de 100 micras (100  $\mu\text{m}$ ), y preferiblemente menor de 20 micras (20  $\mu\text{m}$ ), y las dimensiones laterales de la cámara son preferiblemente de varios centímetros, la diferencia mayor de 1.000 veces en las dimensiones vertical y horizontal dará como resultado que se alcance el equilibrio en la dimensión vertical de manera extremadamente rápida, mientras el equilibrio en la dimensión lateral necesitará cientos a miles de veces más. Si se analiza la imagen completa de la cámara de reacción tomada o escaneada y las áreas pequeñas discretas de la imagen o escaneo, donde las caras laterales de las áreas de análisis discretas están en el intervalo de 1 a 3 veces la altura de la cámara, el volumen que se está sometiendo al análisis estará en un equilibrio aproximado. Las áreas tomadas a distancias de milímetros o más, laterales respecto de la primera área, tendrán diferentes condiciones de equilibrio. La señal del marcador sensible mezclado se mide antes y después de la mezcla o difusión posterior con los reactivos adicionales, para permitir el cálculo de la concentración final de marcador sensible medido que refleja la dilución relativa de los componentes. En los casos en los que hay presentes más de dos líquidos en una cámara, se puede emplear más de un marcador sensible que se pueda distinguir de los otros marcadores sensibles, y cada uno se añade a uno de los componentes añadidos, para permitir el cálculo de las proporciones relativas de cada uno de los componentes. Si se conoce la concentración inicial de los constituyentes de los componentes, se pueden usar las concentraciones relativas para calcular la concentración absoluta de los componentes añadidos en masa por unidad de volumen. Así, las concentraciones relativas de los reactivos añadidos en cualquier área analizada pequeña se pueden tratar como un recipiente o cámara de reacción discreta virtual cuyas concentraciones de reactivos añadidos son calculables, y los resultados de la unión respecto de la ausencia de unión o aglutinación u otra señal empleada en el inmunoensayo que se está realizando se pueden medir y representar gráficamente como la señal obtenida por dilución calculada de muestra o patrón por concentración de anticuerpo añadido o antígeno añadido.

Por lo tanto, un objetivo de esta invención es proporcionar un método en el que se usa la mezcla y la difusión para crear un gradiente de concentración entre dos o más líquidos miscibles en una muestra de película fina en una cámara de forma que el equilibrio en la dimensión fina de la cámara es muy rápido, y las diferencias de concentración en el eje longitudinal de la cámara no alcanzan el equilibrio durante el tiempo del ensayo, y la inter-dilución relativa final se mide mediante la concentración relativa de un marcador sensible que no participa en ninguna de las reacciones químicas deseadas y cuyas propiedades son tales que permiten la medida exacta en cualquier área pequeña de la cámara de reacción.

### Descripción de los dibujos

La FIG. 1 es una vista en planta esquemática de una cámara que se usa en la ejecución del método de esta invención.

La FIG. 2 es una vista de corte transversal de la cámara de la FIG. 1.

La FIG. 3 es una vista de corte transversal ampliada de la cámara de la FIG. 1 que muestra un bombeo de la disolución en la cámara mediante la deformación de la superficie superior de la cámara para facilitar el establecimiento de concentraciones diferentes a lo largo de las caras laterales de la cámara.

La FIG. 4 es una vista en planta de la cámara de la FIG. 1 después de haber completado la etapa de bombeo.

La FIG. 5 muestra una traza de las lecturas de emisión fluorescente de la cámara de la FIG. 1 tal como se toman a lo largo de la línea a-a de la FIG. 4 en la que el marcador sensible es un colorante fluorescente.

La FIG. 6 es una vista en planta de la cámara de la FIG. 1 en la que la cámara tiene deflectores internos que provocarán la mezcla de la muestra cuando la muestra se introduzca primero en la cámara, por lo que no es necesaria la manipulación física de la muestra.

La FIG. 7 es una vista en planta esquemática similar a la FIG. 1, pero con una muestra relativamente pequeña en la cámara.

La FIG. 8 es una vista en planta similar a la FIG. 7 pero que enseña la muestra tras la mezcla.

La FIG. 9 es una vista en planta esquemática de la cámara de la FIG. 1 pero que muestra el resultado de añadir tres líquidos a la cámara.

La FIG. 10 es una vista de corte transversal esquemática de una cámara de ensayo formada de acuerdo con esta invención.

La FIG. 11 es una vista de la cámara de ensayo similar a la FIG. 10, que muestra la aglutinación de partículas que contienen el epítipo objetivo después de añadir una muestra de ensayo a la cámara y la ausencia de aglutinación de

las partículas de control.

La FIG. 12 es una vista de corte transversal similar a la FIG. 10 que muestra los anticuerpos presentes en la cámara de ensayo antes de añadir la muestra de ensayo a la cámara.

5 La FIG. 13 es una vista similar a la FIG. 11 que muestra la aglutinación de partículas que contienen el epítipo objetivo después de añadir una muestra de ensayo a la cámara y la ausencia de aglutinación de las partículas de control.

La FIG. 14A es una vista en planta compuesta de una cámara de ensayo que muestra la presencia de partículas aglutinadas que contienen el epítipo objetivo en la muestra y la ausencia de aglutinación de las partículas de control.

10 La FIG. 14B es un gráfico de las partículas aglutinadas en la muestra tomado de un barrido a lo largo de la línea a-a, y muestra la localización del punto de corte T de la ausencia de aglutinación de partículas en la muestra.

### Descripción detallada de la invención

15 La FIG. 1 es una vista superior esquemática de una cámara 1, en este caso un cuadrado, cuyo corte transversal se muestra en la FIG. 2. La cámara está compuesta de placas superiores e inferiores relativamente finas, al menos una de las cuales debe ser transparente. En la cámara se introducen dos o más líquidos, y uno es la muestra 3 a analizar y el otro es el reactivo 4 necesario para el análisis. Al menos uno de estos líquidos tiene un marcador disuelto que puede ser fluorescente, tal como un colorante fluorescente, o un colorante absorbente, tal como rojo fenol o similares. El marcador no debe interferir químicamente con la señal analítica deseada, ni la señal del marcador se debería ver afectada por ninguna señal o productos de reacción del análisis de una manera que no se pueda compensar.

20 En el caso mostrado, el líquido 4 es el reactivo de análisis que contiene un marcador fluorescente, y el líquido 3 es la muestra a analizar. Si los líquidos se introducen en la cámara en cantidades iguales, en las direcciones indicadas, se encontrarán aproximadamente en la región 5. La FIG. 3, que también es una vista de corte transversal ampliada de la cámara, demuestra cómo se pueden mezclar parcialmente los líquidos. Si una de las superficies de la cámara se "bombee" arriba y abajo, se dará la mezcla de los líquidos, aproximadamente a lo largo de la línea 6, lo que da como resultado el gradiente de dilución mostrado en la FIG. 4, que es una vista superior de la cámara.

25 Después de un periodo adecuado de mezcla, se deja reposar la cámara durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que la difusión vertical complete la mezcla de los líquidos dentro de un segmento vertical determinado. En este momento, los líquidos de las regiones 7 y 8 todavía están completamente sin diluir y representan el estado original de los líquidos antes de mezclar. Si se toman lecturas de fluorescencia del marcador a lo largo de la línea a-a, el resultado se puede observar en la FIG. 5, que es una vista de corte transversal de la cámara a lo largo de la línea a-a, con un gráfico superpuesto que muestra la fluorescencia de la cámara en cada posición relativa y un segundo gráfico que muestra la absorbancia óptica del analito.

30 Debido a que el nivel de señal 9 representa el del reactivo marcador sin diluir, y el nivel de señal 10 representa el nivel de fondo de la muestra, la región de la cámara que corresponde al nivel de señal 11 contiene una muestra que se ha diluido exactamente a la mitad. Así, la concentración del analito deducida a partir de la señal de la reacción deseada se puede multiplicar por dos para obtener la concentración exacta. Si, en este caso, se sabe que la señal del analito es demasiado elevada debido a la presencia de demasiado analito en la mezcla en esa región, solamente se necesita encontrar una región con una señal de marcador equivalente a la de la región 12, que es una dilución mayor, y después multiplicar en consecuencia el resultado de la absorbancia del analito.

35 De manera similar, en condiciones en las que está presente el efecto prozona, el instrumento informa del resultado de analito más elevado obtenido después de tener en cuenta todas las diluciones, y también informa de que se ha realizado este cálculo.

40 La muestra se puede mezclar mediante otros medios distintos de "bombear" la cámara. Por ejemplo, la FIG. es una vista superior esquemática de una cámara con deflectores 13 que sirven para provocar la mezcla de la muestra cuando los líquidos se introducen como se muestra.

45 No es necesario que cierta porción de la muestra o del reactivo permanezca sin diluir. Por ejemplo, en la FIG.7, que es otra vista superior esquemática de una cámara con una muestra 14 relativamente pequeña, en la que en este caso la muestra es el líquido que contiene el marcador, y un área 15 grande de reactivo que no contiene el marcador. Antes de mezclar, se toman lecturas de referencia en las regiones 16 y 17, y después de mezclar (FIG. 8), no queda muestra sin diluir, pero los valores de referencia originales se pueden usar para los mismos cálculos como se describió anteriormente. Este caso particular, en el que se mezcla uniformemente un marcador con la muestra, es especialmente adecuado para los casos en los que se necesita una proporción de dilución relativamente elevada.

50 Todos los casos mostrados muestran la formación de un gradiente de dilución, pero esto puede no ser siempre necesario. En los casos en los que sea suficiente una única dilución aproximada, la muestra y el reactivo marcador

(o la muestra marcada) se pueden mezclar hasta la uniformidad y se puede tomar una lectura de cualquier región adecuada, de nuevo mediante el uso de la concentración del marcador para calcular la dilución real final.

5 En los casos anteriores, se supuso que el grosor de la cámara fue uniforme, pero esto no es absolutamente necesario. Sería aceptable que una cámara tuviera un grosor en el punto de medida que se conociera o se pudiera determinar por otros medios; p.ej., la posición de lectura absoluta en el caso de una cámara de una forma geométrica definida, o un grosor que se puede medir por medios independientes del marcador, tales como interferometría o mediante los sistemas descritos en las patentes de EE.UU. n<sup>o</sup>s 6.127.184, 6.723.290 y 6.929.953.

10 El grosor de la cámara debe ser lo suficientemente pequeño como para que no se desarrollen células de convección, y también lo suficientemente pequeño como para que se pueda dar la mezcla vertical completa mediante difusión en un periodo de tiempo razonable. En la realización preferida, la cámara tiene un grosor menor de 1 mm, y preferiblemente menor de 200  $\mu\text{m}$ . El área de la cámara es en gran medida irrelevante, pero para la mayoría de las aplicaciones es adecuada un área de alrededor de 4  $\text{cm}^2$ .

15 En los casos en los que la cámara se debe incubar durante un tiempo prolongado tras la mezcla para que se desarrolle una reacción, el gradiente puede tender a disminuir debido a la difusión más allá de los límites deseados. En estos casos, se puede usar un agente de incremento de la viscosidad, tal como dextrano, polioxietileno o similares, o un agente que puede formar al menos un gel parcial, tal como gelatina o agar, para retrasar adicionalmente la difusión.

20 Una aplicación adicional especialmente importante de esta invención son los medios mediante los cuales se puede usar para proporcionar una curva de calibración simultánea y una dilución analítica. Las curvas de calibración se usan con frecuencia para calibrar un análisis dado, en el que se analizan patrones conocidos de concentraciones variables para generar una curva de respuesta de la señal analítica frente a la concentración de la muestra. Cuando después se mide la muestra que contiene la concentración desconocida de analito, la señal analítica se compara con la curva de calibración para proporcionar la concentración del analito en la muestra. Esto necesita múltiples análisis, en recipientes distintos, y si la reacción no es repetible a lo largo del tiempo, esto puede necesitar una repetición de este proceso con cada ronda de análisis. Existe una situación similar con el uso del material de control, que son, de hecho, patrones de concentraciones conocidas, que se analizan junto con la muestra en serie para asegurar que el análisis está funcionando correctamente. Estas dos situaciones se pueden evitar mediante un uso particular de la invención descrita.

30 La FIG. 9 muestra una celda de muestra 18 en la que se introducen tres líquidos, y la muestra contiene la concentración desconocida de analito, el reactivo contiene el marcador, y un patrón de concentración adecuada. Se pueden usar deflectores 19 para impedir la mezcla completa de los constituyentes. Cuando la cámara se ha equilibrado como se describió previamente, se usan las lecturas a lo largo de la línea 21 para generar una curva de calibración, mediante el uso del método descrito previamente, y las lecturas a lo largo de la línea 20 se usan para hallar la dilución de la muestra adecuada para el análisis. Así, se puede realizar una curva de calibración y un análisis de la muestra simultáneo en la misma cámara de reacción, lo que asegura que las condiciones de reacción para la muestra y los patrones son idénticas. Se podría analizar más de una muestra en una única cámara alterando la geometría, con tal de que se dé la mezcla adecuada. Lo que se está midiendo es la luz por píxel del área escaneada.

40 Se realiza un ensayo de aglutinación en la cámara de ensayo como se ha descrito, con las siguientes características adicionales para efectuar un ensayo serológico. Preferiblemente, habrá presentes partículas de control, similares en composición química a las partículas que expresan el epítipo objetivo, pero que carecen del epítipo objetivo, en la muestra junto con las partículas objetivo. Las partículas de control son distinguibles por su color u otras características de las partículas que contienen el epítipo objetivo, de forma que normalmente no se debería dar la aglomeración inducida por el ligando de las partículas de control. Si se da una aglutinación significativa de las partículas de control, esto indica una aglutinación inespecífica, y esta circunstancia se puede usar para determinar la validez del ensayo. Por ejemplo, si se aglutina un 50% de las partículas que contienen el epítipo objetivo, y se aglutina menos del 10% de las partículas de control, esto indicaría un ensayo positivo. Si se aglutina un número significativo igual de partículas de control y de partículas que contienen el epítipo objetivo, el ensayo no es válido. Cuando no hay una aglutinación significativa ni del objetivo ni de los controles, significa que el antígeno objetivo que es específico para el epítipo objetivo no está presente en la muestra que se está ensayando. Este resultado también se considera que es un ensayo válido de un resultado negativo.

55 La FIG. 10 es una vista de corte transversal esquemática de una cámara de ensayo que tiene al menos una superficie transparente 101 de la construcción general descrita anteriormente. En una superficie de la cámara están adheridas primeras partículas 102 cuyas superficies expresan o contienen el antígeno 103 al que se dirige el anticuerpo objetivo. Las partículas pueden ser artificiales, tales como látex, látex-estireno, estireno, policarbonato, o similares, con el antígeno unido a la superficie mediante cualquiera de varios medios muy conocidos en la técnica, o pueden ser naturales, tales como polen, bacterias, levaduras, mohos u hongos. Las partículas deben tener un tamaño que permita determinar que se ha dado la aglutinación de las partículas, y tienen preferiblemente un tamaño en el intervalo de 0,2  $\mu\text{m}$  a 20  $\mu\text{m}$ . Las partículas están adheridas a, y preferiblemente cubiertas por, un revestimiento soluble 104, que puede estar compuesto de carbohidratos, tales como trehalosa, que protege la

60

actividad del antígeno 103. En la cámara de ensayo también hay partículas de control 115 que tienen antígenos de superficie 114 a los que no se dirige el anticuerpo objetivo. Las partículas de control 115 están en el mismo intervalo de tamaños que las primeras partículas 102, y están formadas preferiblemente por los mismos materiales que las primeras partículas 102.

- 5 Cuando se añade a la cámara una muestra de líquido 105 que contiene los anticuerpos 106 a detectar, se disuelve el revestimiento soluble 104, lo que libera las partículas 102 y las partículas de control 115 y expone el antígeno adherido 103 al anticuerpo 106 (si está presente en la muestra). Tal como se muestra en la FIG. 11, que muestra la cámara de la FIG. 10 cierto tiempo después de haber añadido la muestra, el anticuerpo 106 de la muestra, si está presente en una cantidad suficiente, provocará que las primeras partículas 102 se aglutinen para formar al menos
- 10 pares de partículas 107, o, si está presente a una concentración mayor, para formar agrupamientos 108 mayores. Es fácilmente evidente que la inspección de la cámara mediante un instrumento automatizado puede detectar la presencia de agrupamientos de las partículas mediante diversos algoritmos de procesamiento de imágenes muy conocidos en la técnica. En el ejemplo ilustrado en la FIG. 11, las partículas de control 115 no están aglutinadas ni agrupadas entre sí.
- 15 En el ejemplo proporcionado, se ha supuesto que el anticuerpo 106 es polivalente, tal como Ig-M, que es el anticuerpo formado en las primeras etapas de una respuesta a una infección. Si la respuesta inmunitaria dura más, sin embargo, estará presente el anticuerpo Ig-G, que no es polivalente y es menos eficaz para provocar el agrupamiento. Para llevar a cabo un mejor agrupamiento en ese caso, la capa soluble 104 debería contener un anticuerpo anti-Fc polivalente activo para unir los fragmentos Fc del anticuerpo no polivalente 110 a detectar. Así,
- 20 cuando se disuelve la capa 104, el anticuerpo anti-Fc 109 se libera y se une a los anticuerpos 110, de hecho, creando una forma de anticuerpo polivalente 110 que puede agrupar las partículas 102 tal como se muestra en las FIGS. 12 y 13.

Las FIGS. 14A y 14B son vistas superiores esquemáticas de cámaras que combinan las características de la descripción anteriormente citada y la presente descripción, y un gráfico que representa la presencia de partículas

25 agregadas frente a la posición a lo largo de la línea a-a, respectivamente. La muestra 112, mezclada con un marcador como se describió previamente, y un diluyente 113 se introduce en una cámara de una manera que permite la formación de una dilución en gradiente. Después de un periodo de incubación adecuado, que dependerá de la naturaleza del antígeno y del anticuerpo que se detecta, la cámara se escanea a lo largo de la línea a-a y se localiza la región T, tal como se observa en la FIG. 14B, que representa la posición en la que ya no se da

30 aglutinación o agrupamiento. El recíproco de la dilución de la muestra en este punto, tal como se determina mediante la concentración relativa del marcador en esta área, es igual al título del anticuerpo. Por ejemplo, si la concentración del marcador es 0,2 comparado con la del área de la muestra original 112, el título es 5. Las partículas de control sin aglutinar 115 también se muestran en la FIG. 14A.

- 35 Se debería indicar que se pueden detectar otras reacciones inmunológicas además de la aglutinación o agrupamiento, tales como la precipitación, en las que el antígeno y los anticuerpos forman un complejo visible en vez de partículas agrupadas. También se debería indicar que los medios descritos en la presente invención se pueden emplear también en otros tipos de inmunoensayos. En el último caso, con la presente invención no hay necesidad de evitar los efectos prozona, sino que la presente invención se puede usar para optimizar el intervalo de trabajo en el ensayo y se puede realizar sin ninguna desviación de las especificaciones contenidas en la presente descripción.
- 40 Aunque la invención se ha mostrado y descrito con respecto a realizaciones detalladas específicas de la misma, los expertos en la técnica entenderán que se pueden hacer diversos cambios en la forma y el detalle de la misma sin apartarse del alcance de la invención.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para realizar un ensayo de aglutinación serológica para uno o más anticuerpos analito objetivo (106) en una muestra líquida (105), y dicho método comprende las etapas de:
- 5 a) proporcionar una cámara plana fina (1) que tiene superficies planas opuestas (101), al menos una de las cuales es transparente;
- b) colocar una cantidad de primeras partículas detectables (102) en dicha cámara plana (1), y dichas primeras partículas (102) contienen, en sus superficies, un antígeno (103) contra el que se dirigen los anticuerpos analito objetivo (106);
- 10 c) colocar segundas partículas de control (115), similares en tamaño y forma a dichas primeras partículas (102), en dicha cámara (1), y dichas partículas de control (115) difieren de dichas primeras partículas (102) en el color o la fluorescencia u otras características distinguibles, y dichas partículas de control (115) están desprovistas de dichos antígenos (103);
- d) permitir o provocar que dichas primeras partículas detectables (102) y dicha muestra (105) se mezclen entre sí, por lo que dichos anticuerpos analito objetivo (106), cuando están presentes, provocarán la aglutinación de dichas primeras partículas (102);
- 15 e) formar una imagen o escanear electrónicamente dicha mezcla para detectar agregados individuales de partículas mediante el análisis de patrones de intensidad de píxeles que resultan de la agregación de las partículas detectadas; y
- f) determinar la presencia o ausencia de aglutinación significativa de partículas comparando las señales de las primeras partículas agregadas (107, 108) con las señales de las partículas de control agregadas.
- 20 2. El método de la reivindicación 1, en el que la detección de la presencia de aglutinación de partículas se realiza midiendo las áreas de píxeles de las primeras partículas aglutinadas (107, 108) con las áreas de píxeles que contienen las partículas de control aglutinadas.
3. El método de la reivindicación 1, en el que la detección de la aglutinación de partículas se realiza determinando el porcentaje de partículas de cualquier tipo dado que están agregadas o agrupadas.
- 25 4. El método de la reivindicación 1, en el que hay más de una clase de primeras partículas detectables distinguibles por separado, y cada clase contiene antígenos diferentes de forma que se pueden realizar múltiples ensayos simultáneamente en la misma cámara de muestra (1).
5. El método de la reivindicación 1, en el que dichas primeras partículas (102) y dichas partículas de control (115) están marcadas de manera diferencial para ser distinguibles entre sí.
- 30 6. Un método para realizar un ensayo de aglutinación serológica para uno o más antígenos analito objetivo en una muestra líquida (105), y dicho método comprende las etapas de:
- a) proporcionar una cámara plana fina (1) que tiene superficies planas opuestas (101), al menos una de las cuales es transparente;
- 35 b) colocar una cantidad de primeras partículas detectables (102) en dicha cámara plana (1), y dichas primeras partículas (102) contienen en sus superficies un ligando dirigido contra los antígenos analito objetivo que pueden estar presentes en la muestra;
- c) colocar segundas partículas de control (115), similares en tamaño y forma a dichas primeras partículas (102), en dicha cámara (1), y dichas partículas de control (115) difieren de dichas primeras partículas (102) en el color o la fluorescencia u otras características distinguibles, y dichas partículas de control (115) están desprovistas de dichos ligandos;
- 40 d) permitir o provocar que dichas primeras partículas detectables (102) y dicha muestra (106) se mezclen entre sí, por lo que dichos antígenos analito objetivo, cuando están presentes, provocarán la aglutinación de dichas primeras partículas (102);
- e) formar una imagen o escanear electrónicamente dicha mezcla para detectar agregados individuales de partículas mediante el análisis de patrones de intensidad de píxeles que resultan de la agregación de las partículas detectadas; y
- 45 f) determinar la presencia o ausencia de aglutinación significativa de partículas comparando las señales de las primeras partículas agregadas (107, 108) con las señales de las partículas de control agregadas.
- 50 7. El método de la reivindicación 6, en el que la detección de la presencia de aglutinación de partículas se realiza

midiendo las áreas de píxeles que contienen las primeras partículas aglutinadas (107, 108) con las áreas de píxeles que contienen las partículas de control aglutinadas.

8. El método de la reivindicación 6, en el que la detección de la aglutinación de partículas se realiza determinando el porcentaje de partículas de cualquier tipo dado que están agregadas o agrupadas.

5 9. El método de la reivindicación 6, en el que hay más de una clase de primeras partículas detectables distinguibles por separado, y cada clase contiene ligandos diferentes de forma que se pueden realizar múltiples ensayos simultáneamente en la misma cámara de muestra.

10. El método de la reivindicación 6, en el que dichas primeras partículas (102) y dichas partículas de control (115) están marcadas de manera diferencial para ser distinguibles entre sí.

10



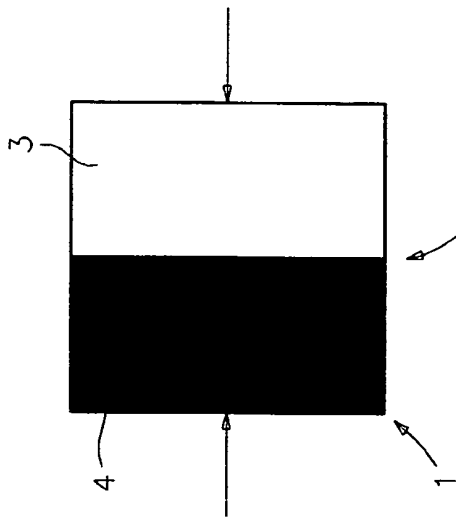


FIG. 1

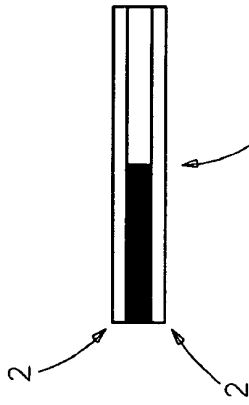


FIG. 2

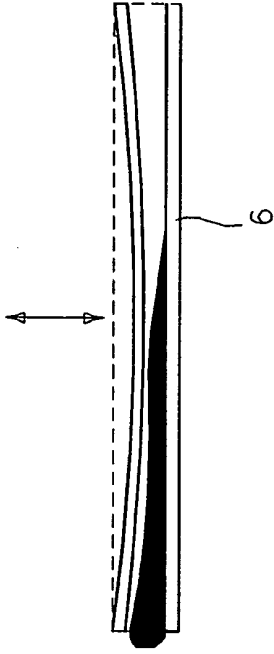


FIG. 3

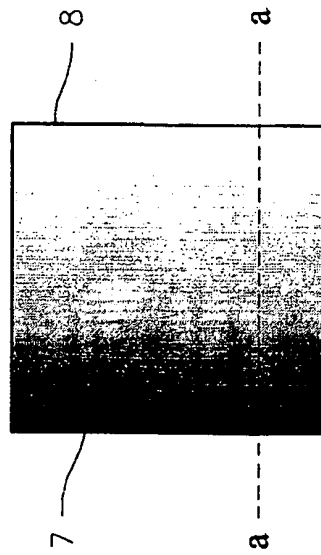


FIG. 4

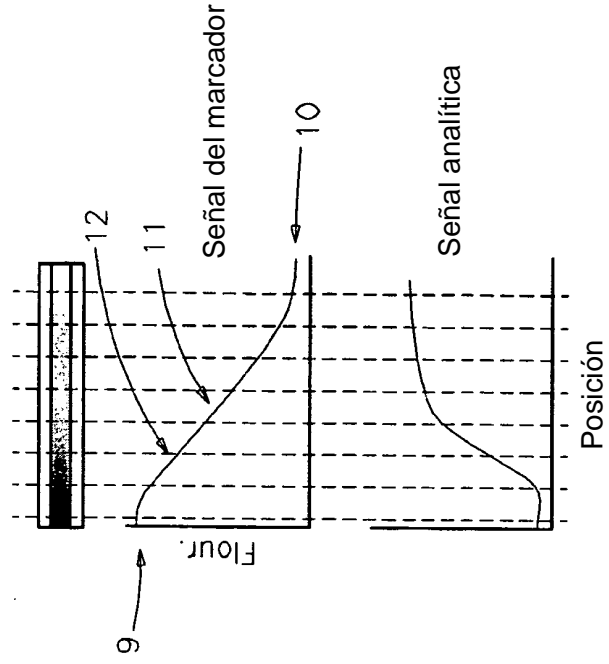
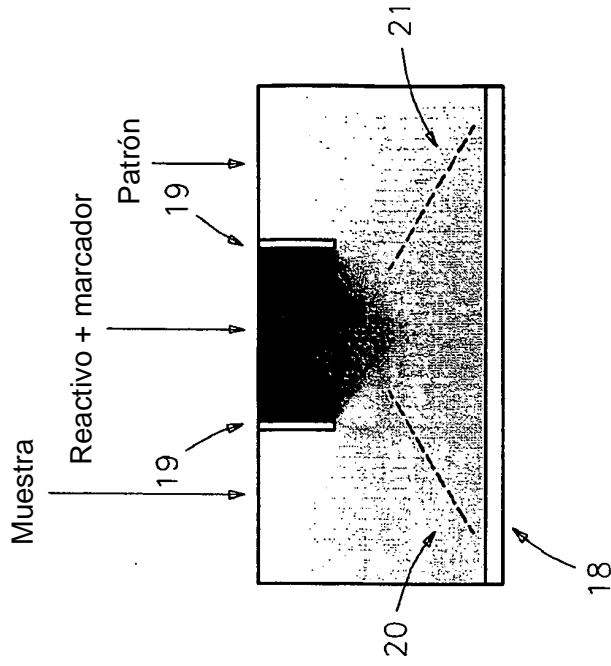
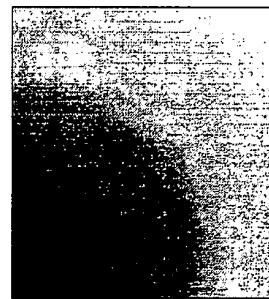
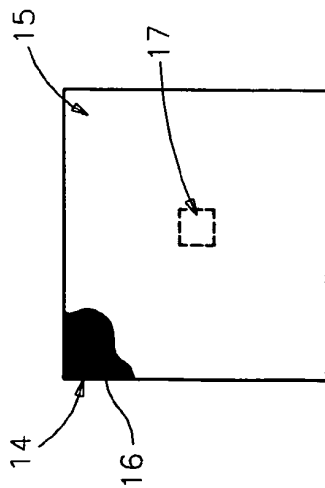
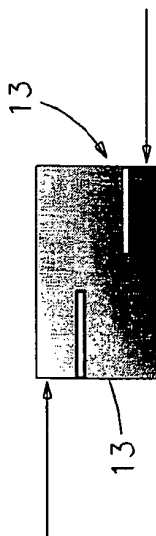


FIG. 5



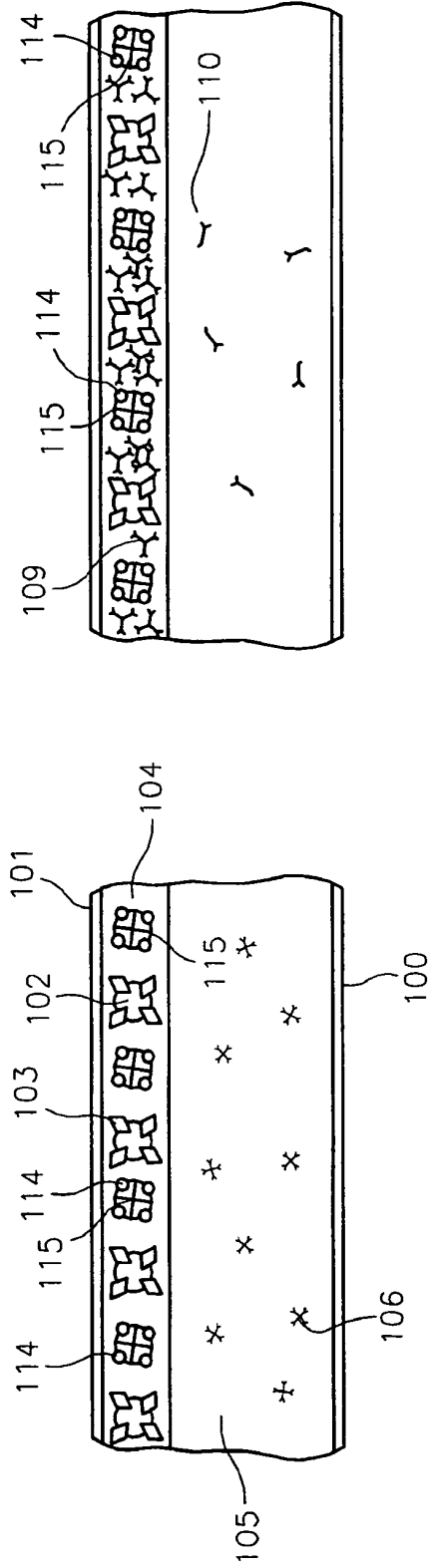


FIG. 10

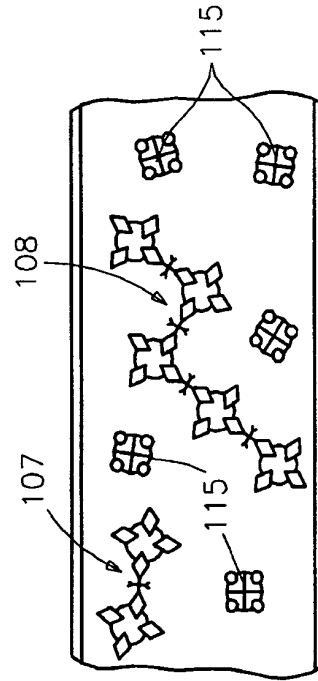


FIG. 11

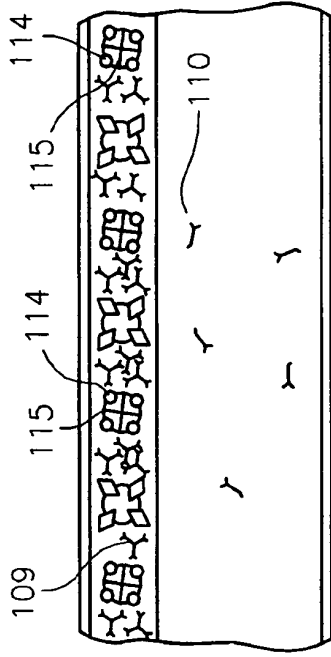


FIG. 12

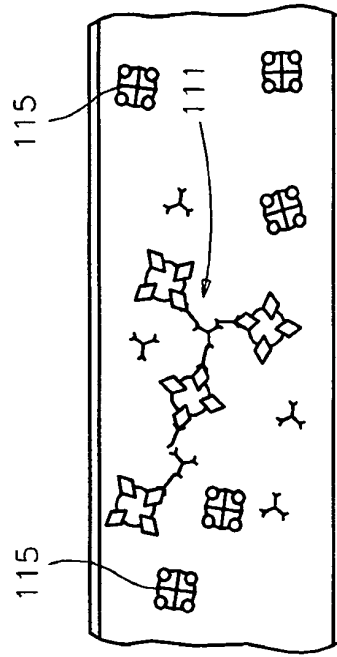


FIG. 13

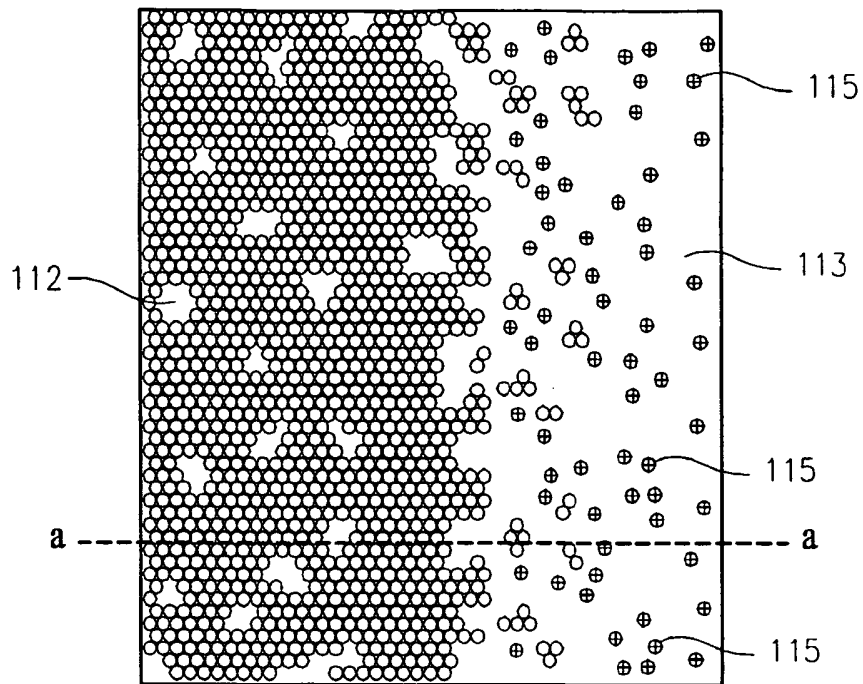


FIG. 14A

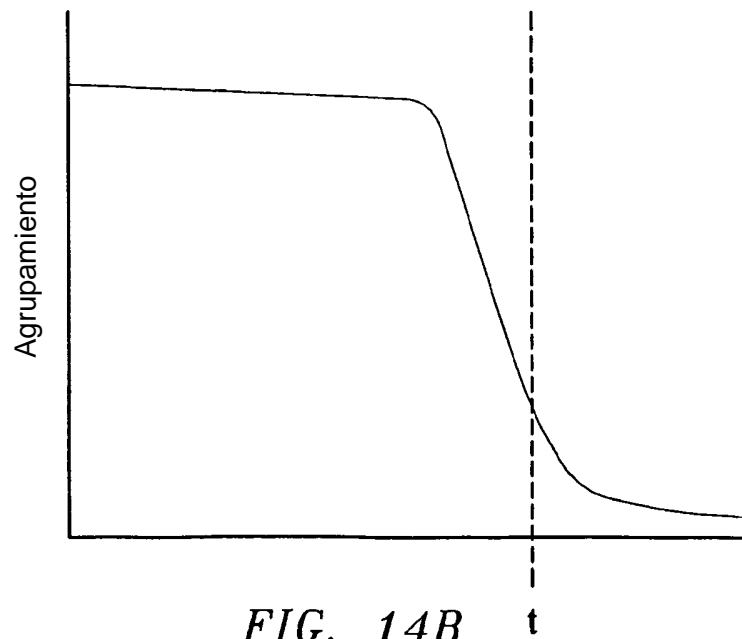


FIG. 14B